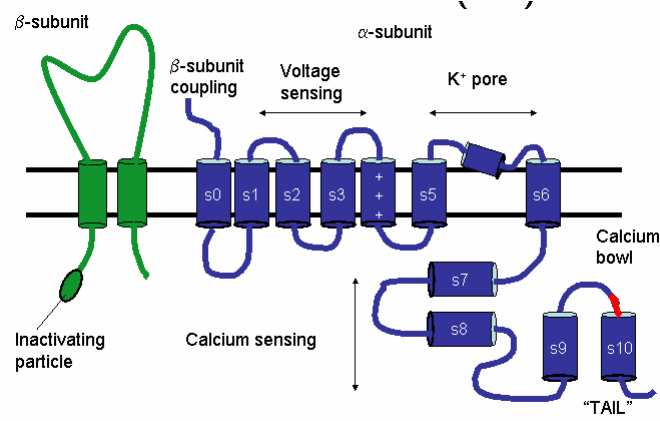


Hvilke kalsium-kanaler aktiverer de presynaptiske BK-kanalene i hippocampus?

Prosjektoppgave i profesjonsstudiet i medisin.



Student: Tine Bruen Olsen, H-00.
Veileder: Johan F. Storm, Professor, MD, PhD
Institute of Physiology at IMBA and Centre for Molecular
Biology and Neuroscience (CMBN), University of Oslo.

Innhold:

<i>Abstract:</i>	3
<i>Introduksjon:</i>	4
<i>Bakgrunn:</i>	5
Kalium (K^+) -kanaler	5
K_{Ca} -kanaler	8
BK-kanaler	9
Ca^{2+} -kanaler	14
Hippocampus, læring og hukommelse	18
Ekstracellulær feltpotensial- registrering	22
<i>Materialer og metoder:</i>	26
<i>Resultater og tolkninger:</i>	29
(1) Blokkert L-type Ca^{2+} -kanaler med nimodipine (20 μM , n=4):	29
(2) Blokkert N-type Ca^{2+} -kanaler med CgTX-6A (1 μM , n=2):	30
(3) Blokkert T- og R-type Ca^{2+} -kanaler med $NiCl_2$ (100 μM , n=4):	31
(4) Blokkerte N- og P/Q- Ca^{2+} -kanaler med CgTX-M7C (2,5 μM , målt EPSP (n=2) og FV (n=1)): ..	32
(5) Figurer	33
<i>Diskusjon:</i>	39
<i>Konklusjon:</i>	42
<i>Referanseliste:</i>	43

Abstract:

Large conductance calcium-activated potassium channels (also known as BK channels, K_{Ca1} , *Slo*, maxi-K) are unique among K^+ -channels in that they are activated both by intracellular calcium ions and by depolarization of the cell membrane. The BK-channels are widespread in the nervous system, but their functional roles in the mammalian brain are not yet fully understood. Recently, Storm's group has shown that BK-channels in presynaptic terminals can regulate transmitter release in the brain, in several glutamatergic pathways within the hippocampus. It is also known that there are several types of voltage-gated calcium channels located in the glutamate terminals: N, P, Q, R, and possibly also L-type. However, it is still not known which of these calcium channel types that are functionally coupled to the presynaptic BK-channels, i.e. which of them provide the Ca^{2+} -ions that can activate these BK-channels. The results from my research project provide several lines of evidence that N- and P/Q-type calcium channels activate the presynaptic BK-channels in *stratum radiatum* of rat hippocampus. However, my results are not sufficiently complete to reach a reliable conclusion. Hence, more experiments are needed to clarify this issue.

Introduksjon:

BK-kanaler skiller seg fra de fleste andre K^+ -kanaler ved at de er underlagt dobbel regulering; det vil si at de aktiveres både av intracellulære Ca^{2+} -ioner og av depolarisering av membranen. Nylig har Storms gruppe vist at BK kanaler i presynaptiske terminaler kan regulere transmitter(glutamat)-frigjøring flere steder i hippocampus (Hu *et al.*, 2001; S. Stuffers, K. Vervaeke & J.F. Storm, ms. in prep.). Det er også kjent at det finnes flere typer spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler i de glutamaterge terminalene: N, P, Q, R, og trolig også L-type (Wheeler *et al.* 1994, 1995 og 1996). Det er imidlertid ukjent ***hvilke Ca^{2+} -kanaler som aktiverer de presynaptiske BK-kanalene.*** Det vil være av stor interesse å fastslå om BK-kanalene aktiveres av de samme Ca^{2+} -kanalene (N, P, Q) som som utløser transmittersekresjon, eller om de er koblet til andre Ca^{2+} -kanaler, f.eks. L-type, som normalt ikke bidrar til transmittersekresjon.

Bakgrunn:

Kalium (K^+) -kanaler

Kaliumkanaler er den fylogenetisk eldste, mest tallrike og mangfoldige klasse av ionekanaler (se **Figur A**). Dette tilskrives dels det store antallet gener som koder for ulike proteiner som inngår i kanalene, men også prosesser som alternativ spleising, som gir multiple mRNA-varianter fra ett gen, posttranslatoriske modifikasjoner, og heteromer sammensetning av subenheter. K^+ -kanaler gjenfinnes hos planter, dyr, sopp, prokaryoter og archebakterier.

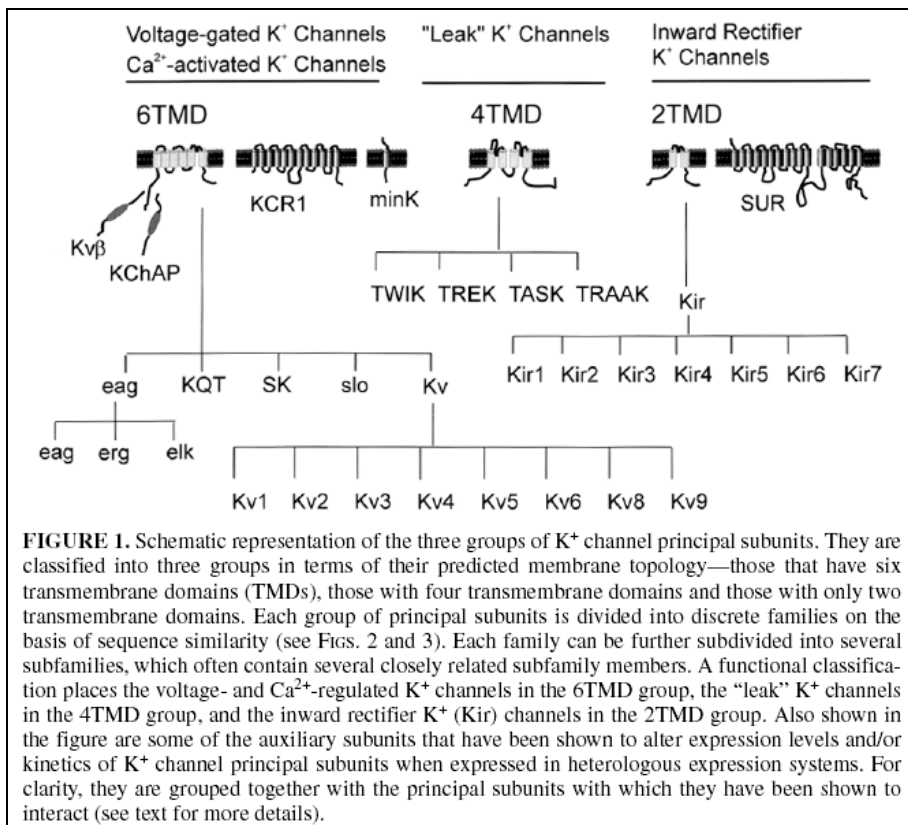
Senere års forskning har vist at defekter i K^+ -kanaler er årsak til en rekke arvelige sykdommer og sykdomsdisposjoner. Arvelige former for epilepsi hos barn skyldes mutasjoner i K^+ -kanalene som danner M-current (trolig dannet av KCNQ2, KCNQ3 og KCNQ5). I hjertet gir mutasjon i KCNQ1 såkalt long-QT-syndrome, som kan gi plutslig hjerrestans og død. Muskeldystrofi, døvhets og cerebellær ataksi er eksempler på andre K^+ -kanalopatier (Jentch et al. 2000).

Na^+ / K^+ -ATPasen sørger for stor K^+ -gradient over cellemembraner, og denne elektrokjemiske gradienten driver K^+ -efflux og repolarisering av cellemembranen ved åpning av K^+ -kanaler. Disse ionestrømmene kan utnyttes på forskjellige måter i ulike celletyper. I nerveceller er de viktige i forbindelse med blant annet opprettholdelse av hvilemembranpotensialet, repolarisering av aksjonspotensialet (se **Figur E**), regulering av transmittersekresjon, samt integrasjon og omforming av synapsepotensialer i dendrittene. Kjemisk modulering av K^+ -kanalene formidler også en rekke av de viktigste effektene av transmittersubstanser, hormoner, farmakologiske midler og metabolske endringer i hjernens celler.

Felles for alle de ulike K^+ -kanalene er at de er oligomere transmembrane glykoproteiner som danner vannfylte porer som er spesifikt permeable for K^+ -ioner. De kan inndeles i subklasser/-familier på flere måter; etter struktur, kinetikk/dynamikk eller deres gating-mekanismer – det vil si hvilke forhold som bestemmer om kanalen er åpen/permeabel for

K⁺-efflux eller ikke. Kanalene kan åpnes eller lukkes av bl.a. transmembrane spenningsendringer, Na⁺, Ca²⁺, G-proteiner, polyaminer og fosforylering.

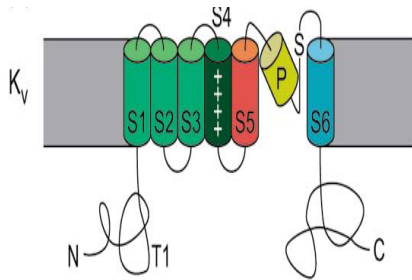
K⁺-kanalene kan strukturelt inndeles i 3 hovedklasser (**Figur A**), etter hvor mange transmembrane domener (TMD) og poredomener de inneholder.



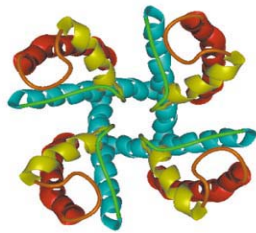
Figur A. Figuren er hentet fra "Molecular diversity of K⁺ channels" (Coetzee et al. 1999).

De spenningsstyrte K⁺-kanalene (K_v-kanalene) er den største gruppen, og er tetramerer av 4 identiske proteiner. Subenheten (**Figur B**) er et transmembran-protein som penetrerer cellemembranen 6 ganger.

De 6 transmembrane segmentene betegnes S1-S6. S1-S4 deltar i gatingen (især S4 er viktig her), S5 og S6 danner sammen med P og S segmentene den poredannende delen (**Figur C**) av K^+ -kanalen.



Figur B. Figuren viser en av 4 identiske subenheter i en K_v -kanal. De 6 transmembrane segmentene betegnes S1-S6. P danner poren i kanalen.



Figur C. Viser poren til en kaliumkanal bestående av 4 identiske subenheter. Fargene svarer til de ulike segmentene som vist i **Figur B**.

K_{Ca}–kanaler

Det finnes tre hovedtyper Ca²⁺-aktiverte K⁺-kanaler (betegnes ofte K_{Ca}–kanaler). Disse har forskjellig aminosyresekvens, konduktans og farmakologiske profiler.

Som for de fleste andre ionekanaler kan de navngis på ulike måter. Etter konduktansstørrelsen kan de benevnes:

- BK-kanaler (*big* konduktans)
- SK-kanaler (*small* konduktans)
- IK-kanaler (*intermediate* konduktans)

I alle fall de to førstnevnte kanalene fins hos alle flercellede organismer, vidt utbredt i mange typer vev, blant annet i mange deler av hjernen og nervesystemet for øvrig. Felles for disse er at de åpnes/aktiveres av intracellulære Ca²⁺-ioner, og slipper K⁺-ioner selektivt ut med elektrokjemisk gradient.

De kalsium (Ca²⁺)-aktiverte K⁺-kanalene står i en særstilling blant K⁺-kanalene, ved at de aktiveres av intracellulære Ca²⁺-ioner - som fungerer som et bindeledd mellom de elektriske signalene i cellenes overflatemembranen, og biokjemiske prosesser i cellens indre. Variasjoner i intracellulær Ca²⁺-konsentrasjon styrer og deltar nemlig i svært viktige intracellulære signalsystemer i de fleste celler. Dette gjelder blant annet kontraksjon i muskelceller, initiering av gentranskripsjon, celledeling og exocytose, for eksempel av transmittersubstans i synapsespalten i forbindelse med nervesignaloverføring. Mengden Ca²⁺-influx gjennom Ca²⁺-kanaler er derfor med på å avgjøre omfanget av disse cellulære prosessene, og reguleres nøye på flere måter, for eksempel via depolarisering. Spenningsstyrte Ca²⁺-kanaler (flere typer: L, N, P/Q, R og T) åpnes ved depolarisering av cellemembranen – og størrelsen av depolariseringen reguleres blant annet av K⁺-kanaler.

BK-kanaler

(også kalt K_{Ca1} , *Slo*, maxi-K) er en type K_{Ca} -kanaler med høy konduktans (~ 250 pS).

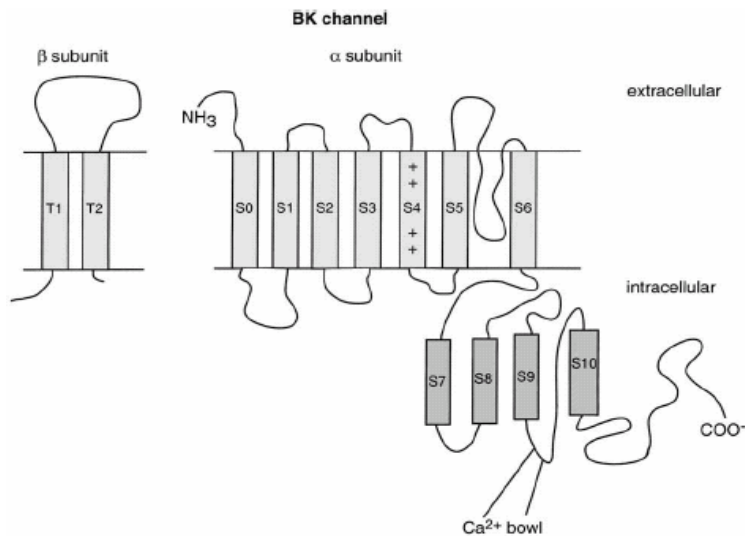
Dette betyr at kun få kanaler kan lede store mengder K^+ -ioner og ha stor effekt på membranpotensialet, særlig i områder med høy motstand (for eksempel nervefibre).

BK-kanalene aktiveres av både depolarisering og intracellulære Ca^{2+} -ioner. Den transmembranale spenningen åpner altså BK-kanalene, og gir K^+ -efflux. Størrelsen på K^+ -effluxen korrelerer med depolariseringen, men er også svært avhengig av konsentrasjonen av intracellulære Ca^{2+} -ioner.

Hvilende cellers cytosol har svært lite Ca^{2+} , i størrelsesorden 10^{-4} mM.

Membrandepolarisering åpner spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler, og gir Ca^{2+} -influx med den elektrokjemisk gradienten. Begge forhold legger dermed til rette for høy K^+ -efflux gjennom BK-kanalene. Slik kan BK-kanalene fungere som effektive regulatorer både av transmembranspenningen og de cellulære prosesser en $[Ca^{2+}]$ -økning fører til.

Strukturelt (**Figur D** og illustrasjon på forsiden) likner BK-kanalene K_v -kanalene. Til forskjell har den poredannende subenheten (α) 7 transmembrane segmenter (S0-S6), og den cytosoliske C-terminale enden er også lenger, med 4 ekstra hydrofobe segmenter (S7-S10).



Figur D. Subenhet BK-kanal. Hentet fra “*Calcium-activated potassium currents in mammalian neurons*” (Sah et al 2002)

Som hos K_v , er S4-segmentet også hos BK en spenningssensor, hvor de positivt ladde aminosyrener spiller en vesentlig rolle.

Genet for α -subenheten i tetrameren heter *Slo1* (eller KCNMA1), og er hos mennesker lokalisert til kromosom 10.

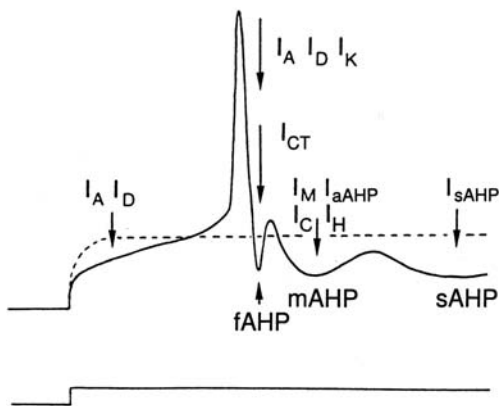
I tillegg til α -subenheten, fins ofte en mindre regulatorisk β -subenhet ko-assosiert (Knaus et al. 1996). Denne er viktig for BK-kanalens følsomhet for Ca^{2+} og depolarisering.

β -subenheten består av to transmembrane domener, og det er påvist 3 ulike varianter ($\beta 1$ - $\beta 3$).

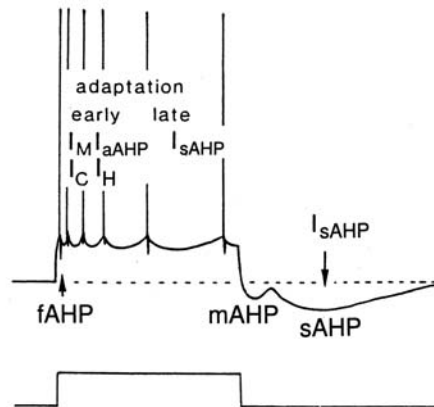
Fenotypisk kan ulike BK-kanaler vise variasjon i konduktans, kinetikk, Ca^{2+} -følsomhet og farmakologi. Denne variasjonen kan muligens forklares av ulike β -subenheter, eller spleisevariasjoner og fosforylering av α -enheten.

BK-kanalenes kinetikk. K^+ -kanaler bidrar til repolariseringen av aksjonspotensialet. Flere typer K_v - og K_{Ca} -kanaler blir aktivert av aksjonspotensialer, og kan gi etterhyperpolariseringer av ulik varighet.

BK-kanaler er under normale forhold aktive i sen fase av repolarisering av aksjonspotensialer i soma (Storm 1987a, 1987b). I presynaptiske terminaler i hippocampus bidrar BK-kanalene ikke til å regulere aksjonspotensial-varighet og transmittersekresjon under normale forhold, men kan aktiveres under spesielle forhold, som gir særlig stor kalsiuminnstrømning (Hu et al. 2001). BK-kanalene danner en ionestrøm som ofte betegnes I_C , og etter aksjonspotensialet danner denne strømmen en rask etterhyperpolarisering som kalles fAHP ("fast afterhyperpolarisation") (se **Figur E**).



Figur E_a.



Figur E_b.

Skjematisk oversikt over de ulike K^+ -strømmene i pyramideceller i hippocampus før, under og etter et enkelt aksjonspotensiale (**E_a**), og etter et tog av flere aksjonspotensialer (**E_b**). Figurene er hentet fra "*Potassium currents in hippocampal pyramidal cells*" (Storm 1990).

Lokalisering av BK.

BK-kanaler fins vidt utbredt i forskjellige vev, især i hjernen, og i stor grad i hippocampus.

I mange nevroner er de å finne i soma, dendritter, og i særlig høy tetthet i axon-terminalene (Knaus et al 1999; Wanner et al. 1999). Immunohistokjemiske og

elektrofysiologiske metoder indikerer at BK-kanalene er særlig å finne presynaptisk i glutamerge synapser (Hua et al. 2001).

BK-kanalenes funksjon

har vært nokså uklar, men senere års forskning er på god vei i kartleggingen av denne. Fra 1993 fant Robitaille et al. gode holdepunkter for at presynaptiske BK-kanaler i muskelendeplaten hos frosk har en nedregulerende effekt på transmittersekresjonen. Man har de senere årene kommet frem til at BK-kanaler i CNS har tilsvarende effekt her. Trolig er BK-kanalene fysisk tett assosiert med Ca^{2+} -kanalene som aktiverer dem, som gjør de i stand til raskt å reagere på Ca^{2+} -influx. Jo mer Ca^{2+} -konsentrasjonen i terminalene øker, desto mer vil BK-kanalene aktiveres. Dette gir økt K^{+} -efflux, og bidrar til å repolarisere aksjonspotensialet og hyperpolarisere terminalen. Dette vil redusere åpningstiden for de spenningsstyrte Ca^{2+} -kanalene i terminalen, og dermed begrense Ca^{2+} -innstrømningen (negativ tilbakekobling), og – som følge av dette – redusere den Ca^{2+} -induserte exocytosen av transmitterstoff (Storm 1987a.; Robitaille et al. 1993). I 2001 påviste J.Storms gruppe at BK-kanalene finnes i den presynaptiske membranen i glutamaterge synapser i hippocampus fra rottehjerne, like ved den synaptiske spalten i CA1-området (Hua et al. 2001). Videre fant de at disse BK-kanalene aktiveres av presynaptisk Ca^{2+} innstrømning og at de under visse forhold som gir særlig stor Ca^{2+} -influx, kan regulere sekresjonen av transmitter (glutamat) og dermed de postsynaptiske potensialene. Ganske nylig har de også funnet holdepunkter for at BK-kanalenes negative feedback-regulering kan fungere som en beskyttelsesmekanisme ved hypoksi, iskemi, metabolsk stress i hjernen og traume, idet aktiveringen av BK-kanalene synes å øke ved denne type tilstander (Runden Pran et al. 2002). En mulig mekanisme her antas å være iskemisk inaktivering av K_v -kanalene, som jo normalt bidrar til repolarisering av AP. Dette gir større depolarisering, videre økt Ca^{2+} -influx gjennom spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler, som gir større Ca^{2+} -konsentrasjon i cytosol – og følgelig aktivering av BK (DiChiara et al. 1997). Dette kan ha stor betydning i glutamaterge synapser, da det finnes

gode indisier for at for sterk (toksisk) glutamat-sekresjon bidrar til celledskade (eksitotoksisitet) ved cerebral iskemi.

Dette kan tenkes å utnyttes i terapeutisk øyemed i forbindelse med for eksempel apoplexia cerebri, ved bruk av BK-kanal-aktivatorer (eksempelvis av typen benzimidazolon NS-1619 og BMS-204352 (Cheney et al. 2001; Gribkoff et al. 1996, 2001)).

Det er rapportert kolokalisering og kobling av BK og N-type Ca^{2+} -kanal i motoriske nevroner i frosk (Robitaille et al. 1993) og hippocampus somata (Marrion et al. 1998). I cerebellums Purkinjenevroner er BK trolig koblet til P/Q- Ca^{2+} -kanaler (Womack et al. 2004). Det er så langt ikke sikkert dokumentert hvilke Ca^{2+} -kanaler som styrer de presynaptiske BK-kanalene i hippocampus.

Ca²⁺-kanaler

Variasjoner i intracellulær Ca²⁺-konsentrasjon styrer og deltar i svært viktige intracellulære signalsystemer i de fleste celler. Dette gjelder blant annet kontraksjon i muskelceller, bevegelse av cellen, initiering av gentranskripsjon, celledeling og exocytose, for eksempel av transmittersubstans i synapsespalten i forbindelse med nervesignaloverføring. Ca²⁺ er også involvert i regulering av andre ionekanaler, for eksempel K_{Ca}-kanaler.

Rask og stor økning av cytosolisk fritt Ca²⁺ avgjør omfanget av disse cellulære prosessene, og reguleres nøye på flere måter, for eksempel via depolarisering (for spenningsstyrte Ca²⁺-kanaler) eller fosforylering.

Ca²⁺-ioner kan komme fra ekstracellulærvæsken, influx skjer da gjennom kanaler i cellemembranen, eller fra intracellulære organeller, via andre typer porer her.

I nervesignalisering vil presynaptiske aksjonspotensialer, generert av Na⁺-influx gjennom spenningsstyrte Na⁺-kanaler, bres til nerveterminalene hvor tettheten av spenningsstyrte Ca²⁺-kanaler er høy. Disse åpnes, med påfølgende Ca²⁺-influx.

I en prosess, hvor Ca²⁺ er triggersignalet, vil vesikler med transmitter fusjonere med cellemembranen og tømmes i synapsespalten.

Elektrofysiologisk har man karakterisert flere typer spenningsstyrte transmembrane Ca²⁺-kanaler, som betegnes L, N, P, Q, R og T. Disse har ulik fordeling i forskjellige vev, og også innen samme celle. De er her knyttet til spesielle funksjoner (eksempler på dette i **Tabell 1**).

I Schaffer-kollateralaksoner fra CA3-celler (se **Figur H**) i hippocampus kjenner man til at tre typer spenningsstyrte Ca²⁺-kanaler er involvert i den synaptiske transmisjonen: P/Q-, N- og R-type. Ved normale forhold (fravær av 4-AP) er hver enkelt av dem ansvarlig for om lag 30-40 % av den synaptiske transmisjonen. L- og T-type Ca²⁺-kanaler er også

påvist i CA1-området, men det er ikke bevist at disse er lokalisert til den presynaptiske membranen eller deltar i den synaptiske transmisjonen.

L-type Ca^{2+} -kanaler aktiveres kun ved nokså kraftig depolarisering (HVA; high voltage activation) av cellemembranen, og konduktansen varierer mellom de forskjellige kanalene (10-24 pS). T-typen aktiveres derimot av liten depolarisering (LVA; low voltage activation) og har lavere konduktans (8 pS).

Struktur.

Ca^{2+} -kanaler består av 5 subenheter (α_1 , α_2 , β , δ , γ). Forskjellene mellom de ulike Ca^{2+} -kanalene består i stor grad av varianter av den poredannende α_1 -enheten, men de andre subenhetene viser også noe variasjon.

Funksjonelt deles Ca^{2+} -kanaler inn i tre hovedfamilier; Ca_v1 , Ca_v2 og Ca_v3 , og viser ulik fordeling i forskjellige typer vev, og har ulike funksjoner (se **Tabell 1**). En celletype kan også ha flere typer kanaler, med ulik fordeling til ulike deler av cellen. For eksempel i nevroner, er N og P/Q særlig lokalisert til nerveterminalene, og har trolig stor betydning for transmittersekresjon. L-type er derimot sterkest representert på nevroners soma og dendritter, og kan ha større betydning for andre Ca^{2+} -avhengige prosesser, for eksempel regulering av genekspresjon.

Ca ²⁺ kanal	Ca ²⁺ strøm	Aktiverings- terskel	α_1 subenhet	Primær lokalisasjon	Spesifikke blokkere	Funksjoner
Ca _v 1.1	L	HVA	α_{1S}	Skjelettmuskel	Dihydropyridiner	Kobling av eksitasjon- kontrakisjon Ca-homeostase Genregulering
Ca _v 1.2	L	HVA	α_{1C}	Myokard Endokrine celler Neuroner	Dihydropyridiner	Kobling av eksitasjon- kontrakisjon Hormonsekresjon Genregulering
Ca _v 1.3	L	HVA	α_{1D}	Endokrine celler Neuroner	Dihydropyridiner	Hormonsekresjon Genregulering
Ca _v 1.4	L	HVA	α_{1F}	Retina		Tonisk neurotransmitterrelease
Ca _v 2.1	P/Q	HVA	α_{1A}	Nerve terminaler Dendritter	ω -Agatoxin og ω -CgTx-MVIIC	Neurotransmitterrelease Dendrittisk Ca-strøm
Ca _v 2.2	N	HVA	α_{1B}	Nerve terminaler Dendritter	ω -CgTx-GVIA	Neurotransmitterrelease Dendrittisk Ca-strøm
Ca _v 2.3	R	H/LVA	α_{1E}	Nerve terminaler Dendritter Neuroner	Ingen kjente.	Neurotransmitterrelease Ca-avh. AP
Ca _v 3.1	T	LVA	α_{1G}	Skjelettmuskel Myokard Neuroner	Ingen spesifikke. (Ni ²⁺ , octanol, amilorid, carbamazepine, fenytoin.)	Repetitiv firing
Ca _v 3.2	T	LVA	α_{1H}	Neuroner Myokard	Ingen spesifikke. (Ni ²⁺ , octanol, amilorid, carbamazepine, fenytoin.)	Repetitiv firing
Ca _v 3.3	T	LVA	α_{1I}	Neuroner	Ingen spesifikke. (Ni ²⁺ , octanol, amilorid, carbamazepine, fenytoin.)	Repetitiv firing

Tabell 1. Sammenfattet fra <http://medweb.bham.ac.uk/research/calcium/SupportFiles/channeltypes.htm> og (Cateterall 2000).

Dette avsnittet bygger i stor grad på følgende referanser (se Referanselisten for utfyllende informasjon):

Berridge et al. 1998, Catterall 2000, Dolphin 2003, Dunlap et al. 1995, Randall 1998, Triggie 1999, Wheeler et al. 1994, 1995 og 1996.

Hippocampus, læring og hukommelse

De senere års forskning innenfor fagområdene kognitiv psykologi og basal nevrofysiologi, samt humane studier med billeddannende teknikker, har gitt en voldsom økning i vår kunnskap om hukommelse.

Hukommelsen kan klassifiseres på flere måter. Vi skiller mellom arbeids- og langtidshukommelse, hvorav sistnevnte kan deles i implisitt og eksplisitt.

Eksplisitt/deklarativ hukommelse har betydning for å huske hendelser, og det er her hippocampusformasjonen spiller en rolle. Hit sendes ny informasjon etter at den har blitt analysert i ulike sensoriske assosiasjonsområder i hjernebarken. Området er viktig for innlagring/læring av ny informasjon, men aktiveres også når dette skal hentes ut igjen. Dette gjelder kun for en kortere periode, anslagsvis et år etter innlæringen – etter dette er hukommelsessporene etablert i utbredte deler av hjernebarken. Særlig er hippocampus viktig for å huske hendelser og episoder, og for å lære kompliserte ferdigheter. Implisitt læring og hukommelse (enklere ferdigheter og vaner) er avhengig av andre deler av hjernen, blant annet motorisk cortex, basalgangliene og cerebellum.

Hippocampusformasjonen består av hippocampus, subiculum og gyrus dentatus, som igjen er del av det limbiske system. Hippocampus hører til allocortex, og danner en valk medialt i sideventrikkelens temporalhorn.

Dette området er blant de deler av hjernen som kan sies å være best studert. Det er to hovedårsaker til dette:

For det første er hippocampus interessant i seg selv, idet den spiller en viktig rolle i disse overnevnte former for læring og hukommelse. Skader av hippocampus og hippocampusformasjonen gir varierende grader av anterograd amnesi, dvs. hukommelsen er borte for ting som læres etter skaden. Alzheimer sykdom er et illustrerende eksempel på dette.

Skade eller sklerose i temporallappen og hippocampus er også den vanligste årsaken til epilepsi.

For det andre er anatomien her særdeles oversiktlig. Den består av distinkte, tydelige laminerte lag, som gjør den svært anvendelig til nevroanatomiske og -fysiologiske studier. Hippocampus kan på denne måten brukes som modellsystem for andre corticale strukturer, som har liknende oppbygning.

Hippocampus' oppbygning og indre impulstrafikk.

Hippocampus og gyrus dentatus er bygd opp av tre hovedlag (**Figur F og G**):

De har begge et overflatisk *stratum moleculare*, bestående av afferente aksoner og apikale dendritter fra underliggende celler.

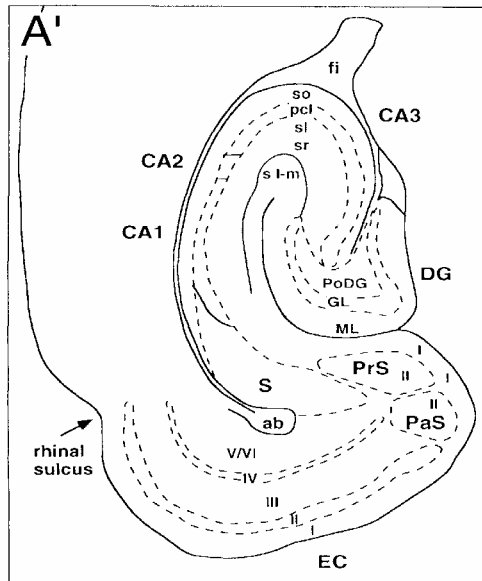
Det midterste laget består av soma til de efferente nevronene, og heter *stratum pyramidale* (med pyramideceller) i hippocampus og *stratum granulare* (med kornceller) i gyrus dentatus.

Det innerste laget kalles *det dype polymorfe laget* (eller *stratum oriens* i hippocampus), og inneholder primært de efferente aksonene til de overliggende cellene (pyramideceller og kornceller), men også dendritter, afferente aksoner, synapser og gliaelementer.

Hippocampus består i tillegg av ytterligere lag:

- *Stratum radiatum*. Her finner vi de mest proksimale segmentene av pyramidecellenes apikale dendritt-tre, og hit kommer afferente axoner og danner synapser.
- *Alveus*. Her finner vi hovedsaklig pyramidecellenes aksoner.
- *Stratum lucidum*. Fins kun i CA3, og består av mosefibre fra korncellene i gyrus dentatus.

I tillegg har hippocampus en langsgående soneinndeling som benevnes CA1-CA3 (se **Figur F**).



Figur F. Cellelagene i hippocampus.

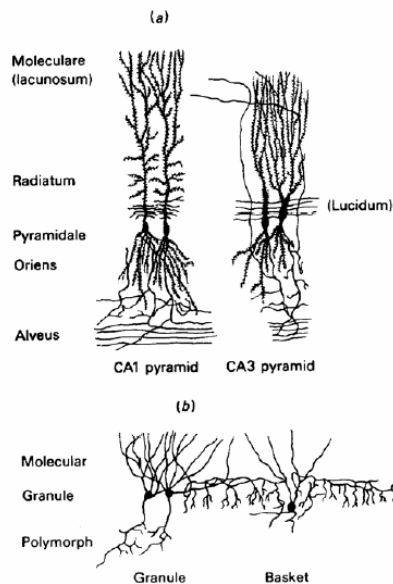
Figuren er hentet fra Paxinos G (1995) *The rat nervous system, 2 utgave*. San Diego, CA: Academic Press.

PaS, parasubiculum; PrS, presubiculum.

ML=stratum moleculare; GL=stratum granulare; PoDG=polymorfe cellelag.

So= stratum oriens; pcl=pyramideceller laget (stratum pyrimidale); sl=stratum lucidum;

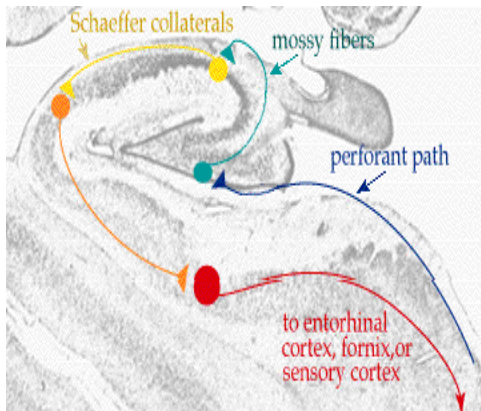
sr=stratum radiatum; sl-m=stratum lacunosum-moleculare.



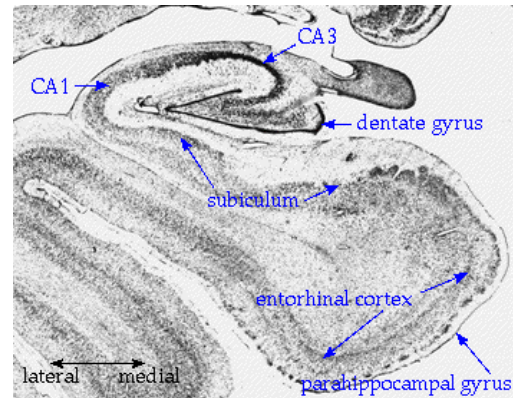
Figur G. Lagingndelingen i hippocampus (a) og gyrus dentatus (b). Figuren er hentet fra

<http://www.cognitivemap.net/HCMpdf/Ch3.pdf>

Impulstrafikken til og innenfor hippocampus er langt mer kompleks enn tidligere antatt. Svært forenklet kan signalene sies å følge en hovedvei, bestående av tre glutematformidlete, eksitatoriske synaptiske ledd (**Figur H og I**):



Figur H. Impulstrafikken i hippocampus



Figur I. Hippocampusanatomien.

Figurene **H** og **I** er hentet fra <http://thalamus.wustl.edu/course/limbic.html>

Afferenter til hippocampus kommer primært via en bane – den såkalte *perforant path* (blåfarget i **Figur H**) - fra entorhinal cortex, som mottar bearbeidede og integrerte signaler fra nesten alle typer sensorisk informasjon. Noen av *perforant path*-fibrene går direkte til pyramideceller i CA1 og CA3, men de fleste ender på korncellene (farget grønn i **Figur H**) (i *stratum moleculare*) i gyrus dentatus. Aksonene derfra, mosefibrene (*mossy fibers*), ender så på pyramidecellene (guldfarget i **Figur H**) i CA3. Kollateraler fra pyramidecellene i CA3, *Schaefferkollateraler*, går til CA1 og danner synapser med pyramidecellene her (orangefarget i **Figur H**). Efferentene fra CA1 pyramidecellene går til subikulum. Her sendes fibre ut til store deler av hjernen, blant annet kortikale områder i frontal- og temporallappen, og mange subcortikale cellegrupper via fornix og corpora mamillare. Via ulike former for synaptisk plastisitet innen denne impulsveien, formes eksplisitt langtidshukommelse, og lagres i multimodale assosiasjonsråder i neocortex.

Referanser til dette avsnittet (se referanseliste for utfyllende informasjon):

Andersen 2004, Brodal 2001, Pacinos 1995

Ekstracellulær feltpotensial- registrering

For registrering av signaler i hjerneceller brukes primært tre hovedtyper metoder;

- feltpotensial registrering
- intracellulær registrering
- ”*whole cell*” registrering

Det er førstnevnte teknikk jeg har brukt i mitt prosjekt, og som jeg beskriver nærmere her.

Feltpotensial-registrering foregår ekstracellulært. Det er en indirekte måte å måle ionestrømmer gjennom cellemembranen. For eksempel, åpning av spennings- og ligandstyrte ionekanaler som gir en Na^+ -strøm inn i cellen, viser seg ekstracellulært som en negativ endring i spenningen målt i forhold til jord.

Ved feltpotensial-registrering kan registreringselektroden plukke opp signaler fra mange hundre synapser. Dette kan vanskeliggjøre tolkningen av signalene.

Skivepreparering av hippocampus.

Hippocampuskive-preparering bør foregå raskt for å gi best mulig kvalitet. Rask avkjøling er essensielt for å nedsette metabolismen og unngå celleskade.

Prosessen starter med dekapitering (spesialdesignet guillotine) av en anestesert (halothan) rotte. Hjernen tas raskt ut avkjøles i en iskald saltløsning (kunstig hjernevæske, ACSF).

Hjernen snittes så ved hjelp av en vibrotom, i skiver med ønsket tykkelse. Hippocampus dissekeres ut, og plasseres i et godt O_2 -mettet interfasekammer med ACSF, minst en time før eksperimentet startes. Dette fordi hjernecellene er nå lett traumatisert, og trenger tid, O_2 og næring for å komme seg, og gi brukbare signaler.

Til overføring av skiven fra interfasekammeret til *submersion*-kammeret i oppsettet, brukte jeg en plastpipette med stor åpning, fylt med ACSF. Dette trinnet bør foregå med størst mulig varsomhet, for å unngå mekanisk traume og forringning av skiven.

I selve registreringen bruker jeg et *submersion*-kammer, dvs at skiven ligger nedsunket i et bad med kontinuerlig perfunderende ACSF, som er forvarmet til 30°C og mettet med 95% O₂ og 5% CO₂.

Skiven kan lett visualiseres ved gjennomlysning med fiberoptisk lys og mikroskop, som begge er installert som en del av oppsettet.

Oppsettet

For stabile signaler må skiven og de to elektrodene være fullstendig immobile i forhold til hverandre. Dette får vi til ved å ”fiksere” skiven til bunnen av badet ved hjelp av lite platina-nett som legges forsiktig på toppen. Dermed unngår vi at skiven beveges av den perfunderende ACSF-strømmen.

Elektrodene holdes stabile, og beveges jevnt ved hjelp av mikromanipulatorer.

Hele oppsettet er dessuten plassert på et vibrasjonssikkert bord, og alle elektroniske komponenter er jordet for at støy ikke skal påvirke registreringene.

Registreringselektroden lages av et kapillær glassrør, som formes/smeltes slik at spissen får en liten åpning, og fylles med filtrert ACSF.

Stimuleringselektroden er laget av lakkert wolframtråd, og sender, fra stimulus isolator, korte, negative strømpulser inn i skiven

Feltpotensialer har sjelden en amplitude større enn 1 mV. Det er derfor nyttig med en DC-forsterker som forsterker signalene, men som selv genererer lite elektronisk støy.

Ved å koble til en PC og en videoopptaker, kan signalene lagres og hentes opp for analysering etter endt eksperiment.

Stimuleringen.

Stimuleringsselektroden sender ut kortvarige (100 μ s) negative strømpulser.

Den negative strømmen ekstracellulært gjør at fibrene i nærheten får en *relativ* positiv innside, og de spenningsstyrte ione kanaler åpnes: Na^+ -influx i presynaptiske fibre, i mitt tilfelle Schaffer-kollateraler, danner aksjonspotensialer her. Denne ”samlingen” av presynaptiske AP registreres som fiber volley (FV). Aksjonspotensialet åpner spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler i de presynaptiske terminalene. Ca^{2+} -influx er signal til frigjøring av transmitter (glutamat), som så bindes til postsynaptiske AMPA-glutamatreseptorer på pyramidecelle-dendritter i CA1-området. (GABA_A - og NMDA-glutamat-reseptorer er på forhånd blokkert av hhv. bicuculine og AP5). Disse reseptorene er eksitatoriske og gir depolariserende strømmer inn gjennom cellemembranen, som registreres som fEPSP - eksitatoriske post-synaptiske feltpotensialer. Aksjonspotensialer, som er resultat av økt kation (Na^+)-influx, blir registrert ekstracellulært som et negativt utslag i spenningen, fordi kationer herfra strømmer intracellulært. Via registreringene får vi dermed visualisert et ”speilvendt” bilde av strømmene gjennom cellemembranen.

Signalene.

Størrelsen på FV korrelerer med antall presynaptiske aksoner som stimuleres.

Hvis stimuleringsstyrken økes, vil cellene i stratum pyramidale kunne danne aksjonspotensialer, som ”forurenses” EPSP-signalene.

Man kan grovt vurdere skivens kvalitet ut fra visse kriterier til signalene;

- EPSP-amplituden bør være nokså stor, helst 1mV.
- Ratio fEPSP/FV bør være stor.
- Signalene bør være ”jevne”, uten mye støy og ”spiking”. Sistnevnte indikerer AP fra stratum pyrimidale.

Man kan trekke flere slutninger ut fra signalene man får. Tolkning jeg benyttet på signalene jeg fikk i mine eksperimenter :

EPSP representerer altså postsynaptiske strømmer gjennom cellemembranene til pyramideceller i CA1, og amplituden korrelerer med transmittermengden frigjort fra presynaptiske fibre. EPSP er derfor et indirekte mål på presynaptisk transmitterfrigjøring. FV representerer depolarisering av presynaptiske fibre på bakgrunn av stimuleringen. Den avsluttende fasen av FV representerer repolarisering av presynaptiske fibre, som jo skyldes K^+ -efflux. Jo mindre K^+ -efflux, jo lenger tid tar repolariseringen. Dette kan ses som en reduksjon av den positive avsluttende fasen til FV og kan også gi økt varighet av den initiale negative fasen av FV (som ved "spike broadening").

Referanse til dette avsnittet:

Ref: <http://files.axon.com/downloads/axobits/AxoBits20.pdf>

Materialer og metoder:

Rotter:

Hannedyr av typen Wistar (Møllegaard, Ejby, Danmark), 3-8 uker gamle.

Skivepreparering:

Rotten bedøves med halothan, dekapiteres, hjernen tas ut og kjøles i iskald kunstig cerebrospinalvæske (ACSF).

Coronal snittede hjernesliver, 400 µm tykke, prepareres ved hjelp av 752M Vibroslice (Campden Instruments, U.K), hippocampi dissekeres ut og holdes levende i opptil 10 timer, in vitro i et romtemperert interfasekammer (et vevsbad med ACSF). (Om sammensetningen av ACSF, se nedenfor)

Stimulering og registreringsforhold:

Registrering ble utført etter minst 1-2 timers restitusjon i interfasekammeret. Skiven ble da plassert i et registreringskammer perfundert med ACSF (men nå med 2mM CaCl₂), mettet med 95% O₂ og 5% CO₂ og som holdt 29-31° C. Det var < 1°C variasjon i løpet av hver registrering.

Farmaka som ble brukt rutinemessig:

Følgende substanser ble brukt i alle forsøkene:

- *Kunstig hjernevæske (ACSF)* ble brukt til skivepreparering, interfasekammer og i registreringskammeret under selve forsøkene. Innhold (i mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 1,25 KCl, 1,25 KH₂PO₄, 1,5 MgCl₂, 1,0 CaCl₂ (2,0 CaCl₂ i registreringskammeret), 16 glukose, og mettet med 95% O₂ og 5% CO₂. I noen forsøk ble også brukt Ca²⁺-fritt medium, CaCl₂ ble da erstattet med MnCl₂. I den forbindelse benyttet vi fosfatfri ACSF initialt, for å unngå utfelling av Mn₃(PO₄)₂ ved bytte til Ca²⁺-fri ACSF.
- *Bicucullin fri base* (5-10 µM) er en GABA-A-antagonist, som tilsettes rutinemessig til hvert forsøk for å unngå inhibitorisk synaptisk transmisjon fra internevroner (bl.a. fra kurvceller til pyramideceller).

- *DL -2-amino-5-phosphonopenttanioc acid (AP5)* (100 μ M) er en NMDA-blokker som også tilsettes rutinemessig til hvert forsøk. Dette for å hindre NMDA-avhengig synaptisk plastisitet; LTD (long-term-depression) eller LTP (long-term-potentialiation).
- *Bovint serum albumin (BSA)* ble tilsatt for å forhindre adhesjon av peptid-toxinene til veggene i perfusjonssystemet, og dermed en lavere "funksjonell" konsentrasjon i badet.

Andre kjemikalier og toksiner:

- *4-AP (4-aminopyridin)* (100-200 μ M): Blokkerer spenningsstyrte K^+ -kanaler (hovedsakelig D- og A-type). 4-AP påvirker ikke BK-kanalene, og en tenker seg derfor at BK aktiveres av den økte depolarisering og dermed også av Ca^{2+} -influxen som følge av blokkerte K_v -kanalene.
- *IbTX* (100 nM): Skorpiontoksin (peptid) som spesifikt blokkerer BK-kanaler.
- *DNQX* (400 μ M): Selektiv non-NMDA antagonist. Brukt til å eliminere EPSP ved FV-studier.
- *Kynurenic acid (4-hydroxyquinoline 2-carboxylic acid)* (7 mM): Bredspektret EAA (eksitatorisk amino acid)-antagonist. Brukt til å eliminere EPSP ved FV-studier.
- *Nimodipine* (20 μ M): Blokkerer L-type Ca^{2+} -kanal.
- *ω -conotoxin (CgTX)-M7C* (2,5 μ M): Selektiv og reversibel N-type Ca^{2+} -kanal-blokker.
- *ω -conotoxin (CgTX)-G6A* (1 μ M): Blokkerer N, P og Q-type Ca^{2+} -kanaler.
- *NiCl₂* (100 μ M): Blokkerer R- og T-type Ca^{2+} -kanaler.

Ekstracellulær feltpotensial registrering:

Stimuleringselektroden (wolframtråd), forbundet med en pulsgenerator, ble plassert midt i stratum radiatum i CA1, hvor CA3-pyramidalceller sender sine Schaffer-kollateraler, og danner synapser her.

Eksitatoriske fibre ble stimulert med parpulsstimulering (20 Hz), som regel hvert 40. sekund (i noen forsøk hvert 30. sekund, andre hvert 60. sekund). Stimuleringsvarighet ble satt til 100 μ s, og intensiteten varierte fra 10 til 1000 μ A, avhengig av signalkvalitet og om EPSP eller FV ble studert.

Registreringselektroden ble plassert omtrent 100 μ m fra stimuleringsstedet.

I forsøk der FV ble studert, tilsatte vi i tillegg DNQX eller kynurenic acid (KA) for å eliminere fEPSP. Dette for å unngå to ting: At denne ”overlapper” og kontaminerer siste del av FV, og å forhindre epileptiform aktivitet etter K^+ kanal-blokade med 4-AP.

Datainnhenting, lagring og analysering:

Registreringen ble gjort med en Axoclamp 2A forsterker (Axon Instruments, Foster City, CA).

Data er innhentet ved hjelp av pCLAMP 7.0 (Axon Instruments) i en frekvens på 10 kHz, digitalisert og lagret også på videokassetter (Instrutec VR-10), målt og plottet ved hjelp av pCLAMP 7.0 og Origin 5.0 og 7.0 (Microcal).

Resultater og tolkninger:

(1) Blokkert L-type Ca^{2+} -kanaler med nimodipine (20 μM , n=4):

Tilsatt	Nimodipine 20 μM	4-AP 100 μM	IbTX 100 nM
Effekt på EPSP	Ingen effekt	Økt amplityde	Økt amplityde

Se **Figur 1**, som viser tidsforløpet gjennom ett enkeltforsøk:

Nimodipine ga ingen endring av EPSP. Dette indikerer at eventuelle presynaptiske L- Ca^{2+} -kanaler ikke er Ca^{2+} -kilden til exocytose av transmitter (glutamat) i disse synapsene. (Dette var forventet; se avsnitt om Ca^{2+} -kanaler).

4-AP ga forventet EPSP-økning, da A- og D-type K^{+} -kanaler blokkeres, og dermed forsinker repolarisering av de presynaptiske fibrene. Dette medfører en økt Ca^{2+} -influx gjennom spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler her, med tilvarende mengde glutamatfrigjøring, som registreres som økt EPSP-amplitude.

IbTX, som spesifikt blokkerer BK-kanaler, ble deretter tilsatt. EPSP-amplituden økte ytterligere, som tyder på at BK-kanalene ikke på forhånd var indirekte inaktivert via blokkering av L- Ca^{2+} -kanalene.

Tilsvarende funn har jeg i tilsammen 4 forsøk, og **Figur 2** viser gjennomsnittlig normalisert EPSP-økning ved tilsetning av 100 nM IbTX etter 20 μM nimodipine.

Altså kan vi slutte at det sannsynligvis ikke er Ca^{2+} -kanaler av L-typen som alene styrer BK-kanalene.

(2) Blokkert N-type Ca^{2+} -kanaler med CgTX-6A (1 μM , n=2):

Tilsatt	4-AP 100 μM	CgTX-6A 1 μM	IbTX 100 nM
Effekt på EPSP	Økt amplitude	Redusert amplitude	Økt amplitude

Se **Figur 3**, som viser tidsforløpet gjennom et enkeltforsøk med CgTX-6A:

CgTX-6A ga en redusert EPSP-amplitude. Dette indikerer at N-kanalene er en av Ca^{2+} -kildene som utløser transmitterfrigjøringen i disse synapsene.

Tilsetning av IbTX til slutt i forsøkene ga igjen en EPSP-økning, som tyder på at BK-kanalene ikke har blitt inaktivert av N- Ca^{2+} -blokaden. Derfor er sannsynligvis heller ikke Ca^{2+} -kanaler av N-typen alene koblet til BK-kanalene.

Dette funnet ble bekreftet i tilsammen 2 forsøk. Gjennomsnittlig IbTX-mediert normalisert EPSP-økning vises i **Figur 4**.

(3) Blokkert T- og R-type Ca^{2+} -kanaler med NiCl_2 (100 μM , n=4):

Tilsatt	NiCl_2 100 μM	4-AP 100 μM	IbTX 100 nM
Effekt på EPSP	Redusert amplitude	Økt amplitude	Økt amplitude

Se **Figur 5**: Tidsforløpet i et enkeltforsøk med NiCl_2 :

NiCl_2 ga en redusert EPSP-amplitude, som indikerer at også R- og/eller T-kanalene er en Ca^{2+} -kilde forut for selve transmitterfrigjøringen i disse synapsene.

Tilsetning av IbTX til slutt i forsøkene ga en EPSP-økning, som tyder på at BK-kanalene ikke har blitt inaktivert av R- og T- Ca^{2+} -blokaden. Derfor er sannsynligvis heller ikke Ca^{2+} -kanaler av R- og T-typene alene koblet til BK-kanalene.

Tre andre eksperimenter viste det samme; gjennomsnittlig IbTX-mediert normalisert EPSP-økning i **Figur 6**.

(4) Blokkerte N- og P/Q-Ca²⁺-kanaler med CgTX-M7C (2,5 uM, målt EPSP (n=2) og FV (n=1)):

Tilsatt	CgTX-M7C 2,5 µM	4-AP 100 µM	IbTX 100 nM
Effekt på EPSP	Redusert amplitude	Økt amplitude	Ingen endring

Tilsatt	4-AP 100 µM	CgTX-M7C 2,5 µM	IbTX 100 nM
Effekt på FV	Breddeøkning ("Spike broadening")	Ingen endring	Ingen endring

Se **Figur 7**, som viser forløpet av ett enkelt forsøk med CgTX-M7C:

CgTX-M7C ga en redusert EPSP-amplitude, som jo tilsier at disse Ca²⁺-kanalene bidrar til Ca²⁺-influxen i forbindelse med transmitterrelease.

IbTX tilsatt etter 4-AP ga ingen tydelig EPSP-økning (amplityden synes heller å minke noe). Det kan her se ut til at BK-kanalene altså på forhånd var inaktivert, via CgTX-M7C-blokkering av N- og P/Q-kanalene.

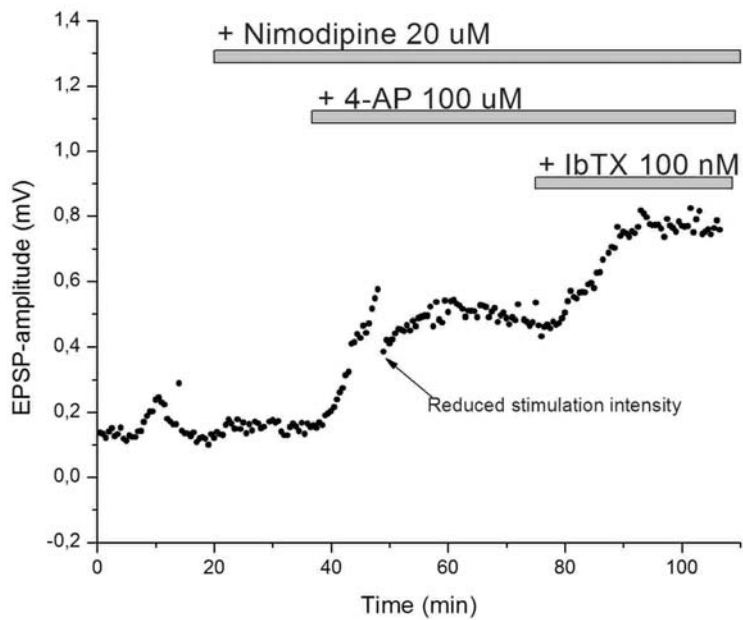
Figur 8 viser den gjennomsnittlige normaliserte EPSP-økning forårsaket av IbTX i to eksperimenter hvor CgTX-M7C var tilsatt på forhånd.

Tilsvarende fant jeg heller ingen FV-endring (**figur 9**).

Dette kan tyde på at BK var inaktivert før IbTX ble tilsatt – og at BK er koblet til N- og P/Q-type Ca²⁺-kanalene.

Koen Vervaeke har på annen side funnet resultater som viser det motsatte, dvs IbTX-indusert EPSP-økning (og muligens en svært liten FV-breddeøkning) etter CgTX-M7C og 4-AP.

(5) Figurer



Figur 1. EPSP-effekten ved tilsetning av 20 μ M nimodipine, 100 μ M 4-AP og 100 nM IbTX (n=1).

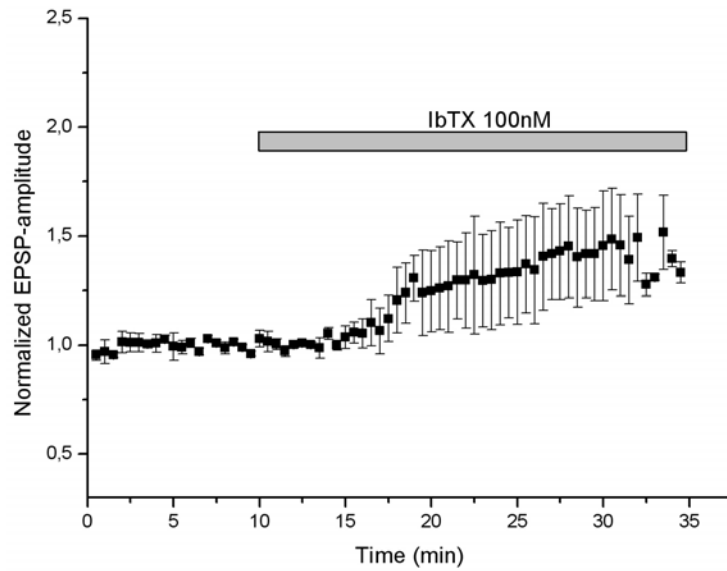


Figure 2. Gjennomsnittlig normalisert EPSP-effekt ved tilsetning av 100 nM IbTX etter 20 μ M nimodipine (n=4). Error bars: \pm SEM.

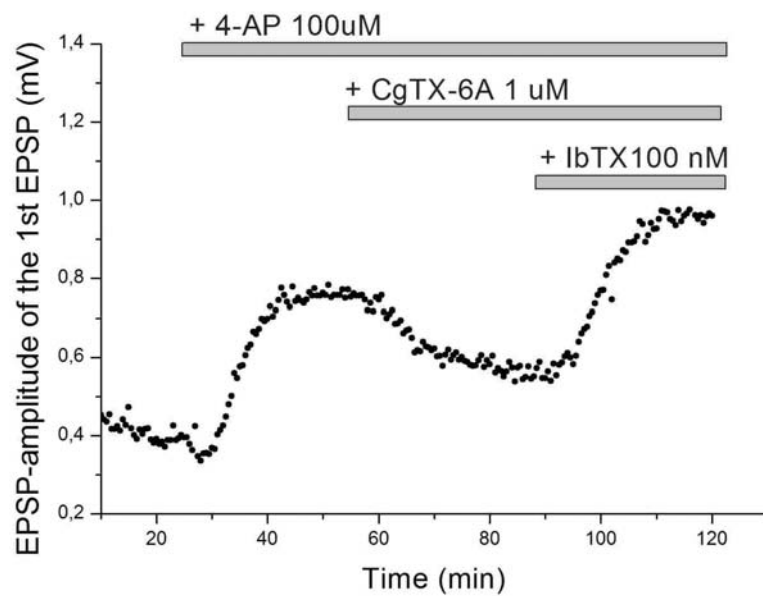
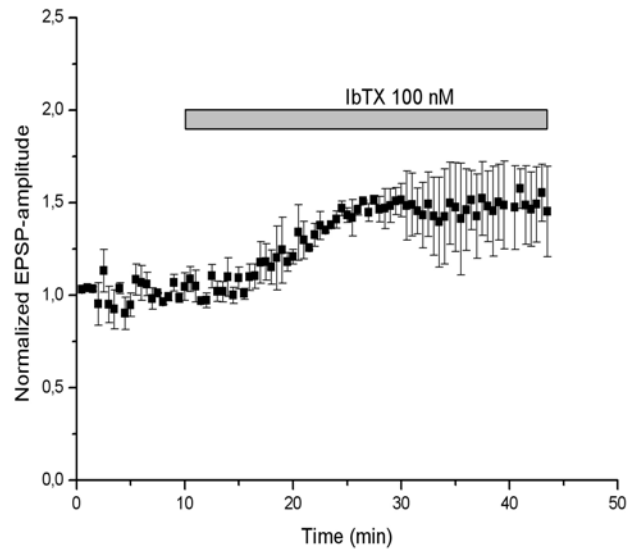
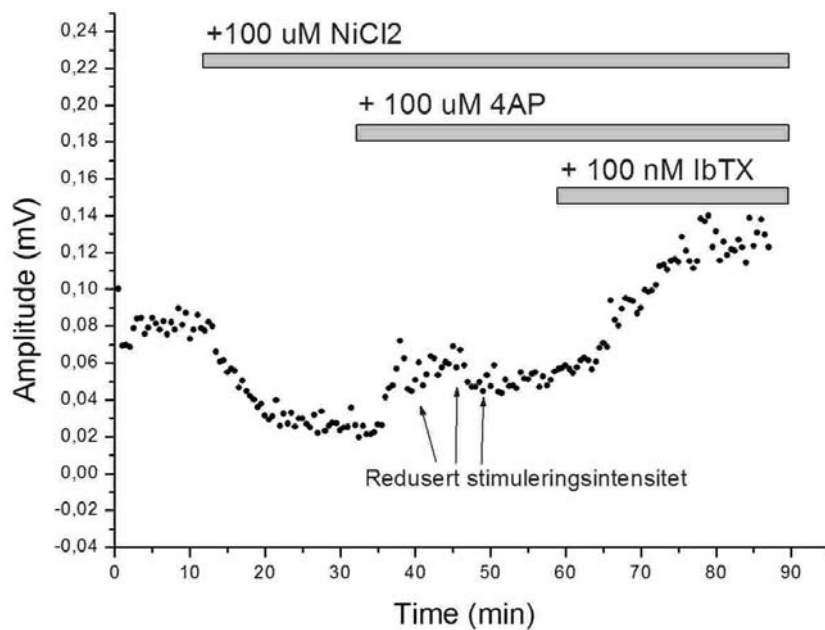


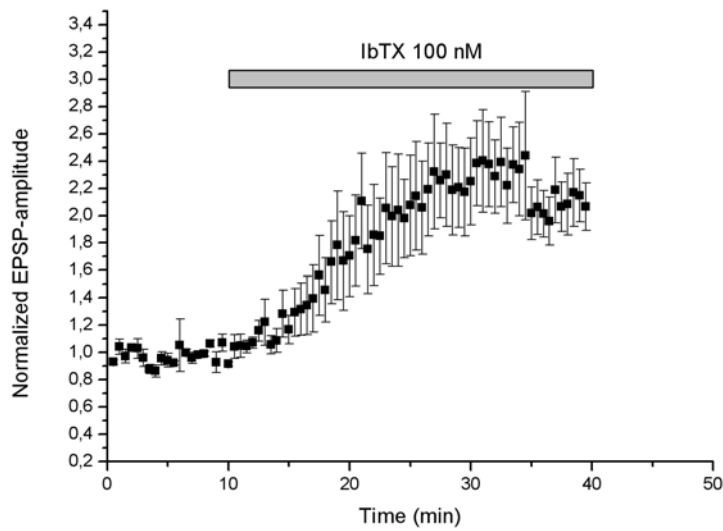
Figure 3. EPSP-effekten ved tilsetning av 100 μ M 4-AP, 1 μ M CgTC-6A og 100 nM IbTX (n=1).



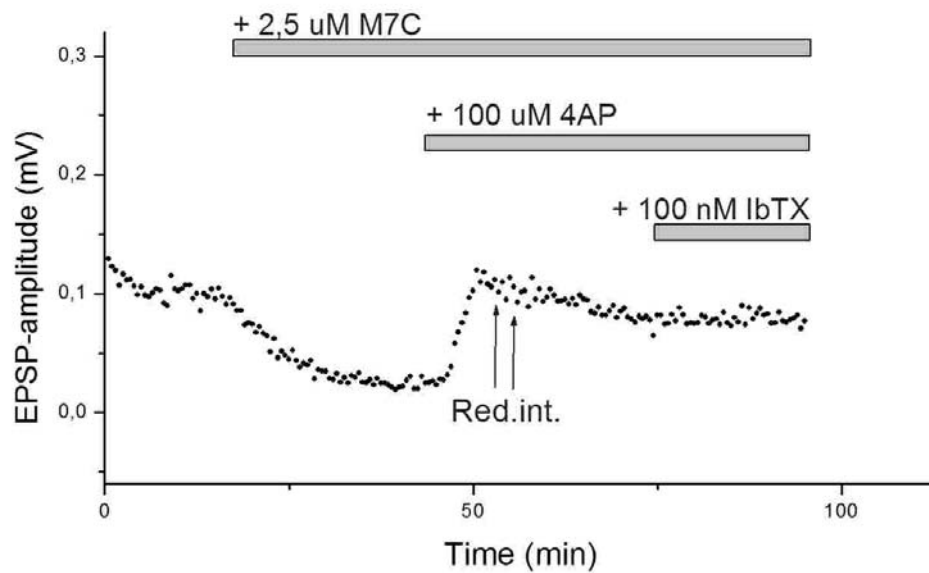
Figur 4. Gjennomsnittlig normalisert EPSP-effekt ved tilsetning av 100 nM IbTX etter 1 μ M CgTC-6A (n=2). Error bars: \pm SEM.



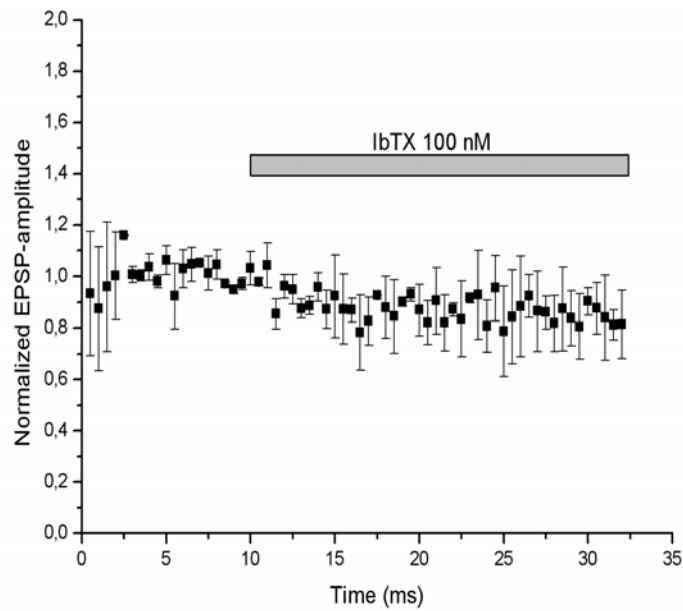
Figur 5. EPSP-effekten ved tilsetning av 100 μ M NiCl₂, 100 μ M 4-AP og 100 nM IbTX (n=1).



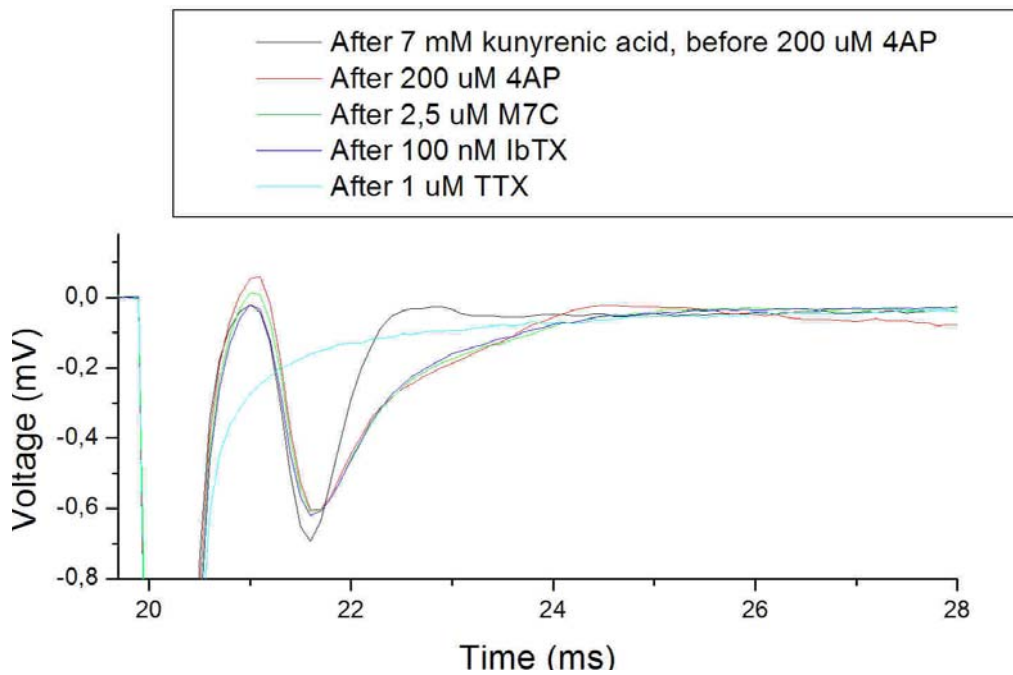
Figur 6. Gjennomsnittlig normalisert EPSP-effekt ved tilsetning av 100 nM IbTX etter 100 μ M NiCl₂ (n=4). Error bars: \pm SEM.



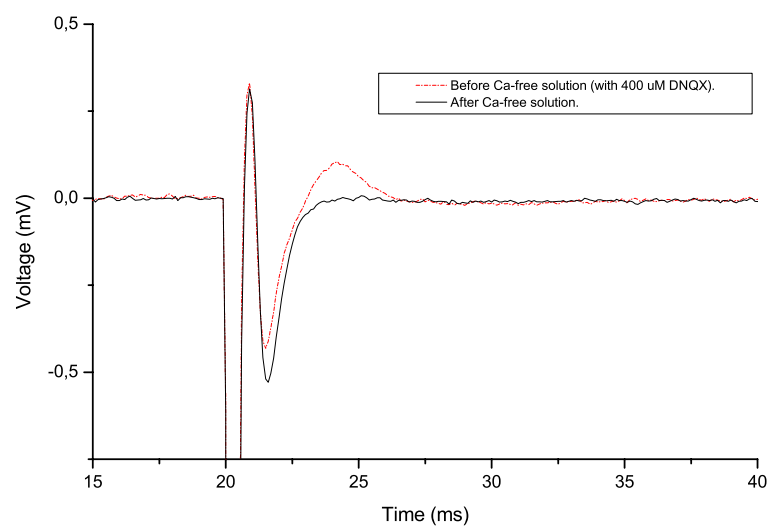
Figur 7. EPSP-effekten ved tilsetning av 2,5 μ M CgTX-M7C, 100 μ M 4-AP og 100 nM IbTX (n=1).



Figur 8. Gjennomsnittlig normalisert EPSP-effekt ved tilsetning av 100 nM IbTX etter 2,5 μ M CgTX-M7C (n=2). Error bars: \pm SEM.



Figur 9. FV-effekten ved tilsetning av 7 mM kunyrenic acid, 200 μ M 4-AP, 2,5 μ M CgTX-M7C, 100 nM IbTX og 1 μ M TTX (n=1).



Figur 10. FV-effekten ved overgang fra 400 μM DNQX til Ca^{2+} -fri ACSF (n=1).

Diskusjon:

Fra mine forsøk kan det se ut som om BK-kanalene er koblet til N- og P/Q-kanalene. Men det er flere forhold som tilsier at det er for tidlig å trekke en slik konklusjon:

Jeg har for få forsøk innen hver forsøksserie til å kunne utelukke eller inkludere de ulike Ca^{2+} -kanalene som BK-aktivatorer. Erfaringsmessig burde jeg inkludere minst 5 forsøk av hver serie for å komme frem til en sikker konklusjon og oppnå statistisk signifikans.

Det viste seg gang på gang at signalene tenderte å svekkes med tid, såkalt "run-down", selv uten tilsetning av stoffer som skulle tilsi en slik utvikling. Jeg vet ikke årsakene til at dette skjedde så ofte i mine forsøk. Jeg har i mine resultater inkludert eksperimenter med de mest stabile signalene, men selv disse viste ofte en gradvis signalsvekkelse. Dette kan vanskeliggjøre tolkningen av signalendringer ved tilsetning av ulike stoffer: EPSP-reduksjon kan i virkeligheten skyldes en naturlig "run-down" fremfor stoffets effekt. Motsatt kan en reell økt EPSP-amplitude kamufleres av "run-down", og tolkes som "ingen EPSP-effekt".

Koen Vervaeke i samme gruppe har også gjort noen pilotforsøk med samme problemstilling. Han har, som jeg, funnet de samme EPSP-effektene ved blokade av L-, R- og T-, og N-type Ca^{2+} -kanaler. I tillegg påviste han en IbTX-indusert breddeøkning av FV etter nimodipine/isradipine og 4AP, samt etter NiCl_2 og 4AP. Dette støtter konklusjonen om at L- og R-/T- Ca^{2+} -kanalene ikke er koblet til BK). Når det gjelder P/Q-kanalene, har han på den annen side resultater som tyder på det motsatte av mine resultater, dvs IbTX-indusert EPSP-økning (og muligens en svært liten FV-breddeøkning) etter henholdsvis CgTX-M7c og 4AP. Det er mulig at den EPSP-økningen som jeg observerte etter tilsetning av IbTX kan ha vært maskert av en "run-down".

Koen Vervaeke fant også at det var umulig å fullstendig eliminere EPSP ved tilsetning av alle Ca^{2+} -blokkere og DNQX, ukjent av hvilken grunn: Andre Ca^{2+} -kilder enn nevnte

Ca^{2+} -kanaler? Flere eksitatoriske transmittorer enn glutamat? Andre glutamatreseptorer?. Dette forutsettes for uforstyrret å kunne studere FV-enderinger i repolariseringsfasen, dvs den sene fasen av FV. Den tidlige fasen av en gjenværende EPSP-rest vil kunne ”overlappe” med den sene fasen av FV og feiltolkes som en spike broadening ved tilsetning av IbTX. Denne gjenværende EPSP har jeg ikke klart å eliminere selv ved meget høye DNQX-konsentrasjoner (*figur 10*), og man kan derfor stille spørsmål om FV er et pålitelig og robust mål på IbTX-effekt. Kan en slik feiltolkning ligge bak Vervækes funn av en liten FV-breddeøkning ved tilsetning av IbTX etter hhv CgTX-M7C og 4AP? Kan det altså bety at det i virkeligheten ikke er noen reell spike broadening, og at BK-kanalene var inaktivert ved blokade av CgTX-M7C? Uansett svaret på dette spørsmålet gjenstår det å finne en forklaring på våre motstridende EPSP-effekter.

En IbTX-indusert EPSP-økning etter inhibisjon av en gitt Ca^{2+} -kanal, ekskluderer ikke nødvendigvis denne Ca^{2+} -kanalen som mulig BK-aktivator. Det kan være at flere typer Ca^{2+} -kanaler er koblet til BK, slik at de ublokkerte BK-aktiverende Ca^{2+} -kanalene kan være ansvarlige for en IbTX-indusert EPSP-økning. En metode for å bekrefte eller avkrefte dette, er å sammenlikne hvert forsøk med en negativ kontroll (dvs uten Ca^{2+} -blokker), og sammenlikne størrelsen på EPSP. Dette har jeg ikke gjort i mine forsøk. Dermed har jeg ikke noe sikkert sammenlikningsgrunnlag for å si om en Ca^{2+} -blokker reduserer IbTX-effekten, som ville indikere at den aktuelle kanalen normalt bidrar til BK-kanalaktivering.

En annen metode, er å tilsette kombinasjon av flere/alle Ca^{2+} -blokkere, for å se om dette fullstendig hindrer aktivering av BK. I et slikt forsøk er det ikke mulig å bruke EPSP som mål på BK-aktivitet, siden EPSP representerer transmitterfrigjøring, som jo forutsetter at de presynaptiske spenningsstyrte Ca^{2+} -kanalene er funksjonelle. Vi er da nødt til å studere FV, som kun skyldes presynaptiske signaler. Dette ble forsøkt av Koen Vervæke, for å teste hypotesen om at alle overnevnte Ca^{2+} -kanaler har evnen til å aktivere BK-kanalene, og når at en kanal blokkeres, tar de andre over. Resultatet her var ikke entydig. Det ble observert en liten FV-breddeøkning med IbTX, som kan tyde på at BK har en annen Ca^{2+} -kilde enn de nevnte Ca^{2+} -kanaler. På den annen side, ble det samtidig

observert en EPSP-rest; denne kan som nevnt overlappe med sen fase av FV, og feiltolkes som en breddeøkning av FV. Hvis dette er tilfellet, betyr det at BK-kanalene var inaktivert, og hypotesen befreftet. En oppklaring av dette problemet gjenstår. Man kan også spørre seg hvor robust og pålitelig IbTX-induserte FV-endringer er som mål på presynaptisk BK-kanalaktivitet. Det er snakk om nokså små utslag, så det kreves svært stabile signaler og lite støy for å se klare, entydige endringer.

Konklusjon:

Resultatene av mine forsøk tyder på at de presynaptiske BK-kanalene i hippocampus er koblet til N- og P/Q-type Ca^{2+} -kanaler. Det er imidlertid flere faktorer som tilsier at det er for tidlig å trekke en sikker konklusjon om dette (se diskusjonen ovenfor). Det behøves derfor ytterligere forskning for å komme frem til en pålitelig konklusjon.

Referanseliste:

Andersen P. Kognitive funksjoner. 2004.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

Andersen P, Raastad M, Storm JF. Excitatory synaptic integration in hippocampal pyramids and dentate granule cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1990;55:81-6.

Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. Neuron 1998 Jul;21(1):13-26.

Best Ben. <http://www.benbest.com/science/anatmind/anatmd3.html#hippo>. 2005

Ref Type: Internet Communication

Brodal P. Sentralnervesystemet. 3. utgave ed. Oslo, Norway.: Universitetsforlaget.; 2001.

Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. Annu Rev Cell Dev Biol 2000;16:521-55.

Cheney JA, Weisser JD, Bareyre FM, Laurer HL, Saatman KE, Raghupathi R, et al. The maxi-K channel opener BMS-204352 attenuates regional cerebral edema and neurologic motor impairment after experimental brain injury. J Cereb Blood Flow Metab 2001 Apr;21(4):396-403.

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, et al. Molecular diversity of K^{+} channels. Ann N Y Acad Sci 1999 Apr 30;868:233-85.

DiChiara TJ, Reinhart PH. Redox modulation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels. J Neurosci 1997 Jul 1;17(13):4942-55.

Dolphin A. Calcium channel diversity. 2003.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. Trends Neurosci 1995 Feb;18(2):89-98.

Edgerton JR, Reinhart PH. Distinct contributions of small and large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels to rat Purkinje neuron function. J Physiol 2003 Apr 1;548(Pt 1):53-69.

Faber ES, Sah P. Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. Neuroscientist 2003 Jun;9(3):181-94.

Gribkoff VK, Lum-Ragan JT, Boissard CG, Post-Munson DJ, Meanwell NA, Starrett JE, Jr., et al. Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels. *Mol Pharmacol* 1996 Jul;50(1):206-17.

Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., Dworetzky SI. The pharmacology and molecular biology of large-conductance calcium-activated (BK) potassium channels. *Adv Pharmacol* 1997;37:319-48.

Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., Dworetzky SI. Maxi-K potassium channels: form, function, and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium. *Neuroscientist* 2001 Apr;7(2):166-77.

Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., Dworetzky SI, Hewawasam P, Boissard CG, Cook DA, et al. Targeting acute ischemic stroke with a calcium-sensitive opener of maxi-K potassium channels. *Nat Med* 2001 Apr;7(4):471-7.

Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm JF. Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization (mAHP) and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 2005 May 12.

Hille B. *Ionic Channels in Excitable Membranes*. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer; 1992.

Hu H, Shao LR, Chavoshy S, Gu N, Trieb M, Behrens R, et al. Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J Neurosci* 2001 Dec 15;21(24):9585-97.

Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 2000 Oct;1(1):21-30.

Jentsch TJ, Schroeder BC, Kubisch C, Friedrich T, Stein V. Pathophysiology of KCNQ channels: neonatal epilepsy and progressive deafness. *Epilepsia* 2000 Aug;41(8):1068-9.

Knaus HG, Schwarzer C, Koch RO, Eberhart A, Kaczorowski GJ, Glossmann H, et al. Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J Neurosci* 1996 Feb 1;16(3):955-63.

Laerum H, Storm JF. Hippocampal long-term potentiation is not accompanied by presynaptic spike broadening, unlike synaptic potentiation by K⁺ channel blockers. *Brain Res* 1994 Feb 21;637(1-2):349-55.

Lancaster B, Hu H, Ramakers GM, Storm JF. Interaction between synaptic excitation and slow afterhyperpolarization current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 2001 Nov 1;536(Pt 3):809-23.

Marrion NV, Tavalin SJ. Selective activation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels by co-localized Ca^{2+} channels in hippocampal neurons. *Nature* 1998 Oct 29;395(6705):900-5.

Meera P, Wallner M, Toro L. A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 9;97(10):5562-7.

Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaiserman I, Ahdut R, et al. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev* 1999 Jul;79(3):1019-88.

Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol* 2000;1(4):REVIEWS0004.

Paxinos G. The rat nervous system. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press.; 1995.

Peters HC, Hu H, Pongs O, Storm JF, Isbrandt D. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat Neurosci* 2005 Jan;8(1):51-60.

Pongs O, Leicher T, Berger M, Roeper J, Bähring R, Wray D, et al. Functional and molecular aspects of voltage-gated K^{+} channel beta subunits. *Ann N Y Acad Sci* 1999 Apr 30;868:344-55.

Qian J, Saggau P. Modulation of transmitter release by action potential duration at the hippocampal CA3-CA1 synapse. *J Neurophysiol* 1999 Jan;81(1):288-98.

Randall AD. The molecular basis of voltage-gated Ca^{2+} channel diversity: is it time for T? *J Membr Biol* 1998 Feb 1;161(3):207-13.

Robitaille R, Adler EM, Charlton MP. Calcium channels and calcium-gated potassium channels at the frog neuromuscular junction. *J Physiol Paris* 1993;87(1):15-24.

Robitaille R, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Charlton MP. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* 1993 Oct;11(4):645-55.

Runden-Pran E, Haug FM, Storm JF, Ottersen OP. BK channel activity determines the extent of cell degeneration after oxygen and glucose deprivation: a study in organotypical hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 2002;112(2):277-88.

Sah P, Davies P. Calcium-activated potassium currents in mammalian neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000 Sep;27(9):657-63.

Sah P, Faber ES. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol* 2002 Apr;66(5):345-53.

Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou XB, Sausbier U, et al. Elevated Blood Pressure Linked to Primary Hyperaldosteronism and Impaired Vasodilation in BK Channel-Deficient Mice. *Circulation* 2005 May 2.

Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, et al. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca^{2+} -activated K^{+} channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Jun 22;101(25):9474-8.

Shao LR, Halvorsrud R, Borg-Graham L, Storm JF. The role of BK-type Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 1999 Nov 15;521 Pt 1:135-46.

Storm JF. Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 1987 Apr;385:733-59.

Storm JF. Intracellular injection of a Ca^{2+} chelator inhibits spike repolarization in hippocampal neurons. *Brain Res* 1987 Dec 1;435(1-2):387-92.

Storm JF. An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 1989 Feb;409:171-90.

Storm JF. Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res* 1990;83:161-87.

Storm JF. K(+) channels and their distribution in large cortical pyramidal neurones. *J Physiol* 2000 Jun 15;525 Pt 3:565-6.

Sun X, Gu XQ, Haddad GG. Calcium influx via L- and N-type calcium channels activates a transient large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ current in mouse neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 2003 May 1;23(9):3639-48.

Triggle DJ. The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca²⁺ channels. *Eur J Pharmacol* 1999 Jun 30;375(1-3):311-25.

Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 1998 Jun;8(3):321-9.

Wang ZW, Saifee O, Nonet ML, Salkoff L. SLO-1 potassium channels control quantal content of neurotransmitter release at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Neuron* 2001 Dec 6;32(5):867-81.

Wanner SG, Koch RO, Koschak A, Trieb M, Garcia ML, Kaczorowski GJ, et al. High-conductance calcium-activated potassium channels in rat brain: pharmacology, distribution, and subunit composition. *Biochemistry* 1999 Apr 27;38(17):5392-400.

Wheeler DB, Randall A, Sather WA, Tsien RW. Neuronal calcium channels encoded by the α 1A subunit and their contribution to excitatory synaptic transmission in the CNS. *Prog Brain Res* 1995;105:65-78.

Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 1994 Apr 1;264(5155):107-11.

Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Changes in action potential duration alter reliance of excitatory synaptic transmission on multiple types of Ca^{2+} channels in rat hippocampus. J Neurosci 1996 Apr 1;16(7):2226-37.

Wheeler DB, Sather WA, Randall A, Tsien RW. Distinctive properties of a neuronal calcium channel and its contribution to excitatory synaptic transmission in the central nervous system. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 1994;29:155-71.

Womack MD, Chevez C, Khodakhah K. Calcium-activated potassium channels are selectively coupled to P/Q-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. J Neurosci 2004 Oct 6;24(40):8818-22.

Wu LG, Saggau P. Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. Trends Neurosci 1997 May;20(5):204-12.

Wu SN. Large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: physiological role and pharmacology. Curr Med Chem 2003 Apr;10(8):649-61.

Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. Nature 2002 Sep 5;419(6902):35-42.